Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München.
Vorstand: Professor Dr. Schittenhelm.

Studien über Gruppeneinteilung und Ausdifferenzierung der Reticulocytenformen und Beitrag zur Frage der Reticulocytenfärbung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Fritz Wagner

München 1937.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Referent:
Professor Dr. Schittenhelm.

Tag der mündlichen Prüfung:
17. Dezember 1937.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Unter den verschiedenen Formen der roten Blutkörperchen, die uns im Blutbild entgegentreten können, spielen die Reticulocyten eine nicht unbedeutende Rolle. Seit rund 50 Jahren bekannt, wurden sie immer mehr Gegenstand eingehender Forschung, sodaß heute über sie ein ziemlich umfangreiches Schrifttum vorliegt. In jüngster Zeit hat sich besonders Heilmeyer mit ihrer Beobachtung befaßt. Er hat eine eigene Färbemethode angegeben, mit der er hohe Reticulocytenwerte beim gesunden Menschen feststellte. Gleichzeitig hat er eine Einteilung der verschiedenen Formen der Vitalgranulation vorgenommen, und hat durch Versuche bewiesen, daß es sich dabei um verschiedene Reifegrade dieser Zellen handeln müsse. Dabei hat er auf die Bedeutung einer Ausdifferenzierung entsprechend der beim weißen Blutbild geübten hingewiesen. Seine Ausführungen gaben Veranlassung zu vorliegender Arbeit, in deren Rahmen die Heilmeyersche Gruppeneinteilung auf ihre Durchführbarkeit und vor allem praktische Verwendbarkeit im klinischen Betriebe untersucht werden sollte. Daneben wurden die Reticulocytenwerte beim Gesunden nach der Methode Heilmeyers bestimmt und vergleichende Versuche mit einer noch höhere Werte liefernden Methode durchgeführt.

Zunächst einiges über das Wesen der Reticulocyten. Reticulocyten sind Erythrocyten in denen durch besondere sogenannte „vitale" Färbemethoden[1] basophile netzförmige Strukturen dargestellt werden können. Die so färbbare Substanz, Substantia reticulo-filamentosa genannt, stammt wahrscheinlich vom Protoplasma der Blutzelle. Sie tritt zunächst zentral gelegen in dichtem Knäuel auf um sich dann allmählich aufzulockern, in die Peripherie zu rücken und schließlich zu verschwinden. Dabei handelt es sich um jugendliche Vorstufen der Erythrocyten, die jeder Erythrocyt im Rahmen seiner normalen Entwicklung durchlaufen muß. Der Reifungsvorgang, das heißt die allmähliche Auflockerung und Auflösung der Netzsubstanz, geht dabei größtenteils im Knochenmark vor sich. Aber noch vor völliger Ausreifung erfolgt der Austritt ins strömende Blut. Ob daneben einzelne Zellen schon im Knochenmark zur Ausreifung kommen, ist noch ungeklärt, wird aber von Heilmeyer als unwahrscheinlich bezeichnet.

Eine andere früher verschiedentlich vertretene Ansicht nahm an, daß es sich nicht um Jugendformen handelt, sondern

---

[1]) „vital" bedeutet, daß die Färbung noch vor Austrocknung und Fixation der Zelle vorgenommen werden muß.

daß das Auftreten der Vitalgranulation als degenerative Entartung der roten Blutkörperchen aufzufassen sei. Sie ist auf Grund der neueren Forschungsarbeiten verlassen und der regenerative Charakter der Reticulocytosen hat heute allgemein Anerkennung gefunden.

In wieweit die Vitalgranulation mit Polychromasie und basophiler Punktierung in Zusammenhang zu bringen ist, darüber herrscht noch keine Klarheit. Während einmal alle drei Erscheinungen als identisch angesehen werden (Denecke), wobei der Unterschied nur quantitativ sein sollte, ein andermal Polychromasie und Vitalgranulation identifiziert werden, dagegen die basophile Punktierung als degenerative Umwandlung der Polychromasie betrachtet wird (Schilling), will Ferrata die Verschiedenheit auch von Vitalgranulation und Polychromasie klar bewiesen haben. Naegeli schreibt allen drei Erscheinungen das eine gemeinsame zu, daß sie aus der gleichen jugendlichen Plasmabasophilie hervorgehen. Er rechnet dabei der Vitalgranulation für die Klinik die größte Bedeutung zu: „Von allen Prüfungen auf jugendliche Erythrocyten ist fraglos die Prüfung auf Reticulocyten die wichtigste geworden, weil sie das viel feinere Reagens darstellt und regenerative Prozesse auch dann noch enthüllt, wenn Polychromasie und basophile Punktierung versagen."

Entsprechend dem langsamen Ausreifungsvorgang, in dessen Verlauf sie sich vom dichten Knäuel bis zu einzelnen Fädchen auflöst, kann uns die Substantia reticulofilamentosa in den verschiedensten Formen gegenübertreten. Tatsächlich hat man auch schon seit langer Zeit diese Mannigfaltigkeit beobachtet und es gelang, die Vermutung, daß es sich hiebei um verschiedene Grade der Reife handeln könne, durch Reifungsversuche in Vitro zu beweisen. Nun lag der Versuch nahe in das Durcheinander der verschiedenen Formen Ordnung zu bringen dadurch, daß man bestimmte Grundtypen aufstellte und die Reticulocytenformen um diese in Gruppen zusammenfaßte. Dies hat Engel 1926 versucht. Ihm folgten andere Einteilungen von Seyfarth, dann von Moldawsky und Gawrilow. Auf sie näher einzugehen würde zu weit führen. Die neueste Gruppeneinteilung, die Heilmeyer 1931 aufstellte, wird, da sie dieser Arbeit zu Grunde liegt, unten noch ausführlich zu besprechen sein.

Worin liegt nun die Bedeutung der Reticulocytenbeobachtung für die Klinik?

Wird das Knochenmark erhöht beansprucht, so wird es — seine Leistungsfähigkeit vorausgesetzt — mehr Zellen ins strömende Blut abgeben, und zwar je größer der Bedarf um so jüngere und unausgereiftere Formen. Somit weist uns das vermehrte Auftreten der

Reticulocyten, besonders auch das Auftreten jüngerer Formen (eine „Linksverschiebung“ des weißen Blutbildes) auf eine vermehrte Tätigkeit des Knochenmarks hin. Heilmeyer sagt: „Die Linksverschiebung der Reticulocytenformen ist das feinste Kriterium der Knochenmarksreizung.“ Dabei kann der auf das Knochenmark einwirkende Reiz sehr verschiedenartiger Natur sein. In erster Linie ist es der Bedarf an roten Blutkörperchen bei allen möglichen Anaemien, der zur Ausschwemmung von noch unreifen Erythrocyten, also auch zur Vermehrung der Reticulocyten führt. Wieder natürlich vorausgesetzt, daß das Knochenmark in der Lage ist Zellen zu bilden. So werden bei der Biermerschen Anaemie im „Remissionsstadium“ sehr hohe Werte gefunden. Die höchsten Angaben finden sich bei der haemolytischen Anaemie, bei der Duesberg einmal 850 netzhaltige auf 1000 Erythrocyten zählte. Auch nach großen Blutverlusten sind starke Reticulocytosen zu beobachten.

Von anderen Reizen, die in diesem Sinne auf das Knochenmark einwirken, seien hier nur einige wichtige hervorgehoben: es gehören hieher toxische (bei Infektionskrankheiten, bei Bleivergiftungen), dann hormonale (bei Basedow, bei Verabreichung von Schilddrüsenpräparaten und ähnlichen), nervöse (bei verschiedenen Nervenkrankheiten, durch Reizung des Zentralnervensystems durch Bestrahlung), klimatische (Höhenlage), schließlich auch die Reize, die wir auf die Blutbildung durch unsere Therapie ausüben (Eisen, Arsen, Leber). Nach all diesen Einwirkungen hat man eine Zunahme der Reticulocyten im Blutbild beobachtet.

Für den Arzt am Krankenbett ergeben sich im wesentlichen zwei Gesichtspunkte, die ihn zur Zählung der Reticulocyten veranlassen. Erstens ist es ihm zur Sicherung seiner Diagnose und zur Stellung der Prognose wichtig zu ermitteln, ob durch die bestehende Krankheit das Knochenmark zu erhöhter Tätigkeit veranlaßt wird, oder, wenn dies sicher der Fall ist (z. B. bei einer schweren Anaemie), ob es fähig ist den bestehenden Reiz mit gesteigerter Leistung zu beantworten. Je mehr Reticulocyten er im Blute findet, um so sicherer kann er beides bejahen. Zweitens kann ihm das Verhalten der Reticulocyten zeigen, ob seine Therapie von Erfolg begleitet ist. Ihr sprunghaftes Ansteigen nach Leberverabreichung bei der Biermerschen Anaemie, das der Besserung des Blutbildes vorangeht, ist hiefür das beste Beispiel.

Selbstverständlich darf die Reticulocytenbeobachtung allein nicht als absolutes Kriterium für Knochenmarkstätigkeit und Krankheitsgeschehen gewertet werden. Nur im Rahmen der gesamten klinischen Untersuchungen ist sie von ausschlaggebender Bedeutung.

Wir haben gehört, daß die Blutkörperchen noch vor völliger Ausreifung ins strömende Blut gelangen. Es finden sich also auch beim gesunden Menschen im Blut Reticulocyten, wenn auch nur in geringer Anzahl und vorwiegend in den reifsten Formen. Bei Durchsicht der von den einzelnen Autoren angegebenen Durchschnittswerte für den Gesunden zeigen sich ganz erhebliche Differenzen, die durch die Verschiedenheit der angewandten Färbetechnik bedingt sind. Einige Beispiele: Während Engel 6—13 $^0/_{00}$ fand, zählten Seyfarth, Moldawyky und Franke nur etwa 1—2 $^0/_{00}$. Heilmeyer ermittelte mit seiner Methode im Mittel 8 $^0/_{00}$. Spätere Autoren gaben nach eigenen Färbungen noch höhere Werte an, so Schleicher 2—3%, Osgood-Edwin-Mable ca 2% und Ederle 10 bis 25 $^0/_{00}$

Auf die verschiedenen Methoden und ihre zum Teil grundlegenden Unterschiede einzugehen, liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit. Hier sei nur die von Heilmeyer nach Holboll differenzierte Färbung angegeben, nach der zunächst gearbeitet werden sollte.

Färbung nach Heilmeyer:

In einer Pipette wird 0,1 ccm Blut mit 0,025 ccm einer 1%igen Brillantkresylblaulösung (1,0 Brillantkresylblau in 0,9-%iger NaCl-Lösung) aufgezogen und in eine paraffinierte Schale gegeben. Diese kommt sofort in eine feuchte Kammer (mit feuchtem Fließpapier ausgelegte Petrischale), wo sie etwa 40 Minuten bis zur völligen Durchfärbung des Blutes bleibt. Dann wird zur Vermeidung von Sedimentierung mit einem paraffinierten Glasstab umgerührt und ein Tropfen auf einem sorgfältigst gereinigten Objektträger ausgestrichen. Zur Herstellung von Dauerpraeperaten wird nach kurzer Fixierung mit Methylalkohol (2—3 Minuten) mit Giemsa nachgefärbt (15 bis 20 Minuten, 25 Tropfen auf 10 ccm Aqua dest.). Auszählung erfolgt unter Ölimmersion in rechteckigem Zählfenster.

Nach dieser Methode wurden nun Praeperate angefertigt und versucht, die darin enthaltenen Reticulocytenformen in Heilmeyers Gruppeneinteilung unterzubringen. Heilmeyer gibt folgende fünf Grundtypen an:

Gruppe O: Kernhaltige Reticulocyten (Normo- und Megaloblasten). Die vitalfärbbare Substanz liegt als dichtes Netz um den Kern.

Gruppe I: Knäuelformen. Die vitalfärbbare Substanz liegt als Knäuel, bestehend aus dichtem Netzwerk mit eingelagerten Granulis, in der Mitte der Zelle.

Gruppe II: Netzformen. Die Substantia reticulofilamentosa hat

sich aufgelockert und breitet sich netzartig über die ganze Erythrocytenscheibe aus.

Gruppe III: Unvollständige Netzformen. Die Netzsubstanz beginnt sich aufzulösen. Man sieht einzelne Fäden, die nur noch teilweise in Netzstückchen zusammenhängen.

Gruppe IV: Ausreifungsformen. Die Netzsubstanz ist fast ganz aufgelöst. Es finden sich nur noch vereinzelte Reste in Gestalt kleiner Fädchen oder Körnchen, die meist in der Peripherie der Zelle liegen.

Es zeigte sich, daß sich diesem Schema fast alle auftretenden Reticulocytenformen leicht einfügen ließen. Nur bei Grenzfällen kann, da es sich ja um einen fortschreitenden Reifungsprozeß handelt und daher die einzelnen Formen fließend ineinander übergehen, die Zuteilung zu der einen oder der anderen Gruppe Überlegungen kosten.

Heilmeyer hatte die Reticulocyten beim Gesunden nach seiner Methode gezählt und die auf die einzelnen Gruppen entfallenden Werte bestimmt. Dies sollte nun auch hier durchgeführt und die Ergebnisse mit den von Heilmeyer gefundenen verglichen werden. Zu diesem Zwecke wurden die Blutbilder von 50 Gesunden (25 Männern und 25 Frauen) untersucht und zwar von jedem Praeperat 3000 Erythrocyten ausgezählt, die auf sie treffenden Reticulocyten ausdifferenziert und dann ihre Zahl auf 1000 Erythrocyten berechnet. Es ergaben sich folgende Durchschnittszahlen (die Angaben Heilmeyers sind zum Vergleich beigefügt):

		nach Heilmeyer
	‰	‰
Gruppe 0:	—	—
Gruppe I:	0,09	0,1
Gruppe II:	0,4	0,8
Gruppe III:	1,8	1,5
Gruppe IV:	5,2	5,6
Gesamt:	7,5	8,0

Der kleinste bei einem Gesunden ermittelte Wert betrug 3,0 ‰, der größte 13,3‰ (Heilmeyer: 5,0 und 14,0). Die meisten Werte lagen zwischen 5,3 und 10,0.

Es zeigte sich also eine weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen Heilmeyers. Daß die Werte der einzelnen Gruppen gegeneinander etwas differieren, ist nicht verwunderlich, da, worauf oben schon hingewiesen wurde, infolge der fließenden Übergänge die Grenzziehung zwischen benachbarten Gruppen individuell etwas verschieden sein kann.

Vergleichen wir die Reticulocytenzahlen beider Geschlechter, so finden wir sie beim Manne etwas höher (rund etwa 7,8 gegen 7,2 $^0/_{00}$ bei der Frau). Der Unterschied liegt dabei fast nur in der Gruppe IV. Heilmeyer hatte keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern gefunden.

Die bedeutend höheren Werte, die neuere Autoren mit eigenen Färbemethoden fanden, gaben Veranlassung eine dieser Methoden nachzuprüfen. Unsere Wahl fiel auf die von Ederle angegebene Färbung. Ausschlaggebend war dabei, daß diese Methode im Prinzip der Heilmeyerschen nahe steht, also ein Vergleich um so interessanter sein mußte, und zweitens, daß sie wegen ihrer Einfachheit auch für klinische Zwecke verwendbar ist.

Färbung nach Ederle:

Farblösung: Kresylblau 0,5 dazu 0,7%ige Kochsalzlösung ad 100,0.

Blut und Farblösung werden in einer Pipette im Verhältnis von 1:2 aufgezogen (dies Verhältnis kann bei Anaemien oder Polycythaemien entsprechend variiert werden). Nach guter Durchmischung, die durch wiederholtes Ausblasen und Wiederaufziehen des Pipetteninhaltes erzielt wird, bringt man einen Tropfen der Mischung auf einen fettfreien Objektträger und fertigt in der üblichen Weise einen dünnen Ausstrich an. Dieser kommt sofort auf 10 Minuten in eine feuchte Kammer. Nach der rasch eintretenden Trocknung kann sofort ausgezählt werden oder es erfolgt Fixierung mit Methylalkohol und Nachfärbung 15—20 Minuten mit folgender Farblösung: Giemsa 5 Tropfen + Löfflers Methylenblau 5 Tropfen in Aqua dest. 5,0 ccm.

Nach dieser Methode wurden zunächst die Reticulocyten bei 10 Gesunden gezählt. Dabei fanden wir die Zahlen von 10—25 $^0/_{00}$, die Ederle angibt, bestätigt. Im Mittel ergaben sich 17,7$^0/_{00}$. Davon entfielen auf die einzelnen Gruppen:

Gruppe 0	— $^0/_{00}$
Gruppe I	0,2 $^0/_{00}$
Gruppe II	0,8 $^0/_{00}$
Gruppe III	4,7 $^0/_{00}$
Gruppe IV	12,0 $^0/_{00}$
Zusammen:	17,7 $^0/_{00}$.

Ein Vergleich dieser Werte mit den nach Heilmeyer gefundenen zeigt, daß es sich bei diesen größeren Zahlen nicht nur um bessere Erfassung der fast ausgereiften Formen, also der Gruppe IV handelt, sondern daß auch die unvollständigen Netzformen (Gruppe III)

bedeutend häufiger auftraten. Auch die Formen der Gruppen I und II sind deutlich vermehrt.

Dieses Ergebnis reizte zu einer genaueren Nachprüfung. Es wurden deshalb von 10 weiteren Fällen, diesmal Gesunden und Kranken durcheinander, jedesmal gleichzeitig 6 verschiedene Praeperate angefertigt und zwar 3 nach Heilmeyer und 3 nach Ederle. Alle sechs wurden vom gleichen Einstich abgenommen, aber in verschiedenen Pipetten aufgezogen und getrennt voneinander gefärbt. Die verwendeten Farblösungen waren dabei für die drei Praeperate der gleichen Methode jeweils die gleichen. Dieses Vorgehen bezweckte zweierlei: Erstens sollten die Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Färbemethoden festgestellt werden und zweitens sollten uns die nebeneinander laufenden Praeperate der gleichen Färbung einen Einblick in die Fehlergrenzen der Methodik vermitteln.

In jedem Praeperat wurden 2000 Erythrocyten ausgezählt, die auf sie entfallenden Reticulocyten ausdifferenziert und ihre Zahl in pro Mille berechnet. Außerdem wurde, um die zahlenmäßige Differenz beider Verfahren deutlicher zu zeigen, aus den drei Praeperaten der gleichen Methode jeweils der für sie sich ergebende Mittelwert bestimmt. Alle Ergebnisse wurden in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

	Nach Heilmeyer:				Nach Ederle:			
	Praep. 1	Praep. 2	Praep. 3	Mittelwert:	Praep. 1	Praep. 2	Praep. 3	Mittelwert
Fall I:	8,5	8,0	7,5	**8,0**	13,0	17,5	16,0	**15,5**
davon:								
Gruppe II	—	0,5	0,5	0,3	1,0	1,5	1,5	1,3
„ III	2,5	2,0	2,5	2,3	3,5	4,5	4,0	4,0
„ IV	6,0	5,5	4,5	5,3	8,5	11,5	10,5	10,2
Fall II:	20,0	20,0	19,0	**19,7**	34,5	33,5	36,5	**34,7**
davon:								
Gruppe I	1,5	1,5	2,0	1,7	2,0	3,0	2,5	2,5
„ II	3,5	2,5	2,5	2,8	3,5	4,0	4,5	4,0
„ III	9,0	9,5	7,5	8,7	12,5	11,5	16,0	13,3
„ IV	6,0	6,5	7,0	6,5	16,5	14,5	13,5	14,8
Fall III:	7,5	5,5	5,0	**6,0**	19,0	15,5	14,0	**16,2**
davon:								
Gruppe II	—	—	0,5	0,2	1,0	1,0	0,5	0,8
„ III	3,0	2,0	1,0	2,0	6,0	5,5	4,5	5,3
„ IV	4,5	3,5	3,5	3,8	12,0	9,0	9,0	10,0

Fall IV:	22,5	20,5	23,0	**22,0**	34,5	36,0	34,0	**34,8**
davon:								
Gruppe I	0,5	—	—	0,2	1,5	1,5	1,0	1,3
„ II	2,5	2,0	2,0	2,2	3,5	5,5	4,0	4,3
„ III	9,5	8,0	9,5	9,0	12,5	11,5	14,0	12,7
„ IV	10,0	10,5	11,5	10,6	17,0	17,5	15,0	16,5
Fall V:	18,0	19,0	20,0	**19,0**	32,5	33,0	36,0	**33,8**
davon:								
Gruppe I	—	—	—	—	0,5	—	0,5	0,3
„ II	2,0	1,5	2,5	2,0	3,0	3,5	4,5	3,7
„ III	5,5	6,0	6,5	6,0	11,5	10,5	9,5	10,5
„ IV	10,5	11,5	11,0	11,0	17,5	19,0	21,5	19,3
Fall VI:	20,5	19,0	16,5	**18,7**	32,5	30,5	36,0	**33,0**
davon:								
Gruppe I	—	—	—	—	0,5	—	0,5	0,3
„ II	2,0	1,5	1,5	1,7	3,0	2,5	3,5	3,0
„ III	7,5	7,0	5,5	6,7	11,5	10,5	11,5	11,2
„ IV	11,0	10,5	9,5	10,3	17,5	17,5	20,5	18,5
Fall VII:	6,0	4,5	5,0	**5,2**	10,5	13,0	11,0	**11,5**
davon:								
Gruppe I	—	—	—	—	—	—	0,5	0,2
„ II	0,5	—	0,5	0,3	1,0	1,0	1,5	1,2
„ III	1,5	1,0	1,5	1,3	2,5	4,5	3,5	3,5
„ IV	4,0	3,5	3,0	3,5	7,0	7,5	5,5	6,6
Fall VIII:	6,0	7,5	8,0	**7,2**	12,5	15,5	14,0	**14,0**
davon:								
Gruppe II	—	—	—	—	—	0,5	—	0,2
„ III	1,5	2,0	3,0	2,2	3,5	5,5	4,5	4,5
„ IV	4,5	5,5	5,0	5,0	9,0	9,5	9,5	9,3
Fall IX:	25,0	18,0	20,0	**21,0**	34,5	35,0	40,5	**36,6**
davon:								
Gruppe II	5,0	2,5	2,5	3,3	5,5	5,5	6,5	5,8
„ III	9,5	8,0	9,0	8,8	14,5	14,0	15,5	14,6
„ IV	10,5	7,5	8,5	8,9	14,5	15,5	18,5	16,2
Fall X:	12,5	12,0	11,5	**12,0**	22,5	22,0	26,5	**23,7**
davon:								
Gruppe II	—	—	0,5	0,2	1,0	1,5	1,0	1,2
„ III	5,0	4,5	4,0	4,5	9,5	9,0	11,0	9,8
„ IV	7,5	7,5	7,0	7,3	12,0	11,5	14,5	12,7

Aus dieser Tabelle ist ohne weiteres ersichtlich, daß die Methode von Ederle durchwegs Werte liefert, die bedeutend höher

liegen, durchschnittlich sogar fast das doppelte betragen. Sehen wir uns die Verteilung auf die einzelnen Gruppen an, so zeigt sich wieder ganz klar, daß diese Unterschiede alle Reticulocytenformen betreffen.

Greifen wir als Beispiel den Fall VIII der Tabelle heraus: Methode Heilmeyer zeigt uns im Durchschnitt 7,2 $^0/_{00}$, die andere Methode mit 14,0 ungefähr das doppelte. Auf die einzelnen Gruppen verteilt, fehlt bei der ersten Methode die Gruppe II, der Gruppe III gehören 2,2, der Gruppe IV 5,0 $^0/_{00}$ an. Das Verfahren Ederle's zählt für Gruppe II 0,2, Gruppe III 4,5 und Gruppe IV 9,3 $^0/_{00}$, also in jeder Gruppe wieder fast das doppelte.

Diese Gleichmäßigkeit der Differenzen innerhalb aller Gruppen läßt sich in den meisten Fällen ganz ähnlich verfolgen.

Vergleichen wir die Werte der drei Praeperate, die jeweils nach der gleichen Methode getrennt voneinander gefärbt wurden, so finden wir sie bei der Färbung nach Heilmeyer überraschend nahe beisammen liegend. Die einzige Ausnahme bildet Fall IX, bei dem sich etwas größere Unterschiede zeigten. Daraus geht hervor, daß die durch Färbung und Zählung bedingten Resultatschwankungen bei dieser Methode in ziemlich engen Grenzen liegen, eine Tatsache, auf die wir bei der Beurteilung dieses Verfahrens noch zurückkommen müssen. Etwas größere Differenzen zeigen die nach Ederle gefärbten Praeperate.

Wenden wir uns nun der Kritik beider Färbemethoden zu:

Das Verfahren Heilmeyers ist in der Literatur bereits mehrfach besprochen worden. Ederle nimmt eine umfassende Beurteilung vor. Er faßt alle gegen diese Methode vorgebrachten Einwände ungefähr in folgenden Punkten zusammen:

Infolge der langen Färbedauer könne auch in den paraffinierten Gefäßen Gerinnung entstehen, sodaß mit einer künstlichen „Verteilungsreticulocytose" gerechnet werden müsse.

Verhältnis von Farblösung und Blut sei ungünstig. Dadurch müsse die Farblösung zu hoch konzentriert werden, sodaß Niederschläge entstehen könnten. Auch würde der Blutausstrich dadurch zu dicht.

Isolierte punktförmige Granulation, wie sie in Gruppe IV erfaßt ist, könne nicht mit Sicherheit als Vitalgranulation angesprochen werden, vor allem nicht da eine länger als 15 Mi-

nuten dauernde Einwirkung von Kresylblau auf die Erythrocyten zu Kunstprodukten führen würde.

Auf Grund unserer Ergebnisse scheinen einige dieser Einwände zum mindesten praktisch bedeutungslos zu sein. So sprechen die mit großer Gleichmäßigkeit an über 100 Praeperaten gefundenen Werte, vor allem aber die geringen Resultatschwankungen bei dem Versuch, der die ungefähren Fehlergrenzen zeigen sollte, sehr deutlich gegen den Einfluß von durch Gerinnung entstehenden Verteilungsreticulocytosen und gegen die Verwechslung der Formen der Gruppe IV mit durch die Färbung entstehenden Kunstprodukten und Farbniederschlägen. Daß Farbniederschläge entstehen können und tatsächlich immer wieder vorkommen, ist außer Zweifel. Aber sie lassen sich als solche erkennen und von der Zählung ausschließen.

Dabei sei allerdings zugegeben, daß bei nicht nachgefärbtem Praeperat die Farbniederschläge schwerer als solche ausgeschlossen werden können. Aus diesem Grunde wurden alle Zählungen nur an fixierten und mit Giemsa bzw. Giemsa und Methylenblau nachgefärbten Praeperaten vorgenommen.

Richtig ist, daß die Dichte des Blutausstriches sich oft störend bemerkbar macht. Wir sind deshalb dazu übergegangen das Verhältnis von Farblösung und Blut, das Heilmeyer mit 1 : 4 angibt, zugunsten der Farblösung zu verändern. Wir haben Verdünnungen von 1 : 2 und 1 : 1 angewandt, ohne daß sich dadurch Änderungen der Resultate gezeigt hätten. Daraufhin kann man auch mit der Konzentration der Farblösung heruntergehen, aber auch dadurch sind Farbniederschläge nicht mit Sicherheit zu vermeiden.

Im allgemeinen liefert die Färbung nach Heilmeyer sehr schöne, gleichmäßig durchgefärbte und verteilte, leicht auszudifferenzierende Praeperate. Daß durch sie nicht alle Reticulocyten erfaßt werden, ja daß sogar manche junge unausgereifte Form der Zählung entgeht, das mußte uns erst der Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Methode zeigen.

Und nun zur Färbung nach Ederle: Unzweifelhaft ist rein äußerlich ein Vorzug ihre kurze und einfache Durchführung. Dagegen ist die Gleichmäßigkeit in Verteilung und Färbung, die die Praeperate nach Heilmeyer auszeichnete, nicht in gleichem Maße vorhanden. Damit wird es wohl zusammenhängen, daß die Ergebnisse beim gleichen Patienten in weiteren Grenzen schwankten.

Eine Verbesserung der Methodik bedeutet Ederles Vorschlag, bei der Nachfärbung die basische Farbstoffkomponente der Lösung durch Zusatz von Löfflers Methylenblau zu verstärken. Bekanntlich

tritt durch die Fixierung mit Methylalkohol eine völlige Entfärbung des Praeperates, auch der Substantia reticulofilamentosa ein. Bei der nun folgenden Nachfärbung nimmt diese Substanz die basische Komponente der Giemsalösung auf und erhält so ihre blaue Farbe. Nun kam Ederle auf den Gedanken, daß „die gewöhnliche Giemsafärbung mit ihrer sauren Farbstoffkomponente einen Teil der vitalen Granulation überdecken kann". Um dies zu verhindern verstärkte er den basischen Charakter der Lösung durch Zusatz des Methylenblaus. Dadurch wird einerseits die Färbung des Plasmas etwas blasser, anderseits gewinnt diejenige der Netzsubstanz an Intensität. Durch den so verstärkten Kontrast treten die Netzstrukturen mit wunderbarer Klarheit hervor und selbst die feinste Granulation ist noch deutlich zu erkennen.

Nun erhob sich die Frage, in wieweit die höheren Ergebnisse Ederles dem Unterschied in dem eigentlichen Färbeverfahren und in wieweit sie nur der verbesserten Nachfärbung zuzuschreiben sind. Um dies zu ermitteln wurde noch eine neue und letzte Versuchsreihe aufgestellt. Dabei wurden von jedem Fall (auch diesmal wieder Gesunde und Kranke durcheinander) Praeperate nach Heilmeyer und Ederle angefertigt. Die einen Praeperate wurden ganz nach den Angaben von Ederle behandelt. Nach Heilmeyer wurde ein Näpfchen Blut in der feuchten Kammer gefärbt, davon dann vier Ausstriche gemacht und von diesen zwei mit Giemsalösung und zwei mit Giemsa-Methylenblau nach Ederle nachgefärbt.

Dabei sollte sich zeigen, ob und in wieweit die verschiedene Nachfärbung des gleichen Praeperates verschiedene Resultate liefert und ferner ob die Methode Heilmeyers auch bei Anwendung der verbesserten Nachfärbung noch niedrigere Werte liefert, als die andere.

Wieder wurden von jedem Praeperat die auf 2000 Erythrocyten treffenden Reticulocyten ausdifferenziert und in pro Mille berechnet. Tabelle II enthält die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

Tabelle II.

	1	2	3
Fall I:	18,0	25,0	34,5
davon:			
Gruppe II	2,5	4,5	5,5
„ III	8,0	11,0	14,5
„ IV	7,5	9,5	14,5
Fall II:	13,5	19,0	29,0
davon:			
Gruppe II	2,5	4,0	4,5
„ III	5,5	7,0	12,0
„ IV	5,5	8,0	12,5
Fall III:	101,0	140,5	218,0
davon:			
Gruppe I	7,5	12,0	16,5
„ II	17,0	25,5	56,0
„ III	38,0	46,0	71,0
„ IV	38,5	57,0	74,5
Fall IV:	7,5	11,0	15,0
davon:			
Gruppe II	1,5	1,0	1,5
„ III	2,5	3,5	4,5
„ IV	3,5	6,5	9,0
Fall V:	9,5	14,5	22,5
davon:			
Gruppe II	0,5	1,0	2,0
„ III	4,5	5,0	9,0
„ IV	4,5	8,5	11,5

	1	2	3
Fall VI:	13,5	19,0	24,5
davon:			
Gruppe II	—	1,0	1,5
„ III	6,0	9,5	10,5
„ IV	7,5	8,5	12,5
Fall VII:	89,5	120,5	152,5
davon:			
Gruppe I	7,5	10,0	12,5
„ II	23,5	28,0	40,5
„ III	36,5	44,5	55,5
„ IV	22,0	37,5	44,0
Fall VIII:	9,5	12,0	18,0
davon:			
Gruppe III	4,0	4,5	6,5
„ IV	5,5	7,5	11,5
Fall IX:	10,0	14,5	19,5
davon:			
Gruppe I	—	—	0,5
„ II	1,0	1,5	2,5
„ III	3,5	4,5	6,5
„ IV	5,5	8,5	10,0
Fall X:	12,5	18,0	22,5
davon:			
Gruppe II	—	0,5	1,0
„ III	5,0	8,0	9,5
„ IV	7,5	9,5	12,0

Erklärung: Spalte 1 = Färbung nach Heilmeyer, Nachfärbung mit Giemsa.

Spalte 2 = Färbung nach Heilmeyer, Nachfärbung mit Giemsa + Methylenblau.

Spalte 3 = Färbung nach Ederle, Nachfärbung mit Giemsa + Methylenblau.

Spalte 1 und 3 zeigen wieder die großen Unterschiede in allen Gruppen zwischen den beiden Methoden. In Spalte 2 sind die Werte aufgeführt, die sich durch Färbung nach Heilmeyer und Nachfärbung nach Ederle ergaben. Ganz eindeutig halten sich diese gleichmäßig zwischen den beiden anderen.

Was sich durch diese Versuche herausstellen sollte, ist damit geklärt:

Fertigt man von dem gleichen Praeperat zweierlei Nachfärbungen an, so liefert die Nachfärbung mit Methylenblauzusatz nach Ederle etwa um die Hälfte höhere Werte. Die Unterschiede betreffen wieder alle Gruppen ungefähr gleich.

Selbst bei Anwendung der verbesserten Nachfärbung bleiben die nach der Methode Heilmeyers gefundenen Werte noch beträchtlich unter den nach Ederle ermittelten. Es muß also schon in der feuchten Kammer durch das Verfahren nach Ederle eine bessere Durchfärbung des ganzen Praeperates erfolgen.

Damit wären die Versuche mit den Färbemethoden nach Heilmeyer und Ederle abgeschlossen. Worauf es bei diesen Vergleichen ankam, war nicht so sehr die Überlegenheit einer Färbung über die andere herauszuarbeiten. Es sollten vielmehr die Ergebnisse zweier beliebig herausgegriffener Methoden zeigen, daß es durch Verfeinerung der Technik gelang nicht nur die fast ausgereiften Formen besser zu erfassen, sondern auch ganz junge unreife Zellen zur Darstellung zu bringen, die vorher der Zählung entgingen. Muß sich daraus nicht der Schluß ziehen lassen, daß es durch weiteren Ausbau der Färbetechnik gelingen müsse in immer noch mehr roten Blutkörperchen solche Netzformen zur Darstellung zu bringen und so immer mehr Erythrocyten als Reticulocyten zu erkennen?

Was ergibt sich aus allem für den Arzt in Ausübung seines Berufes? Konnte ihm die Verfeinerung der Reticulocytenfärbung wesentlichen Nutzen bringen und muß er bestrebt sein bei seinen klinischen Untersuchungen immer die feinste Methode anzuwenden? Wir glauben beides verneinen zu können. Ihm kommt es ja nicht darauf an möglichst viele Reticulocyten im Blute seines Patienten zu finden, sondern er will wissen, sind die Reticulocyten gegenüber dem Gesunden vermehrt und in welchem Grade sind sie vermehrt. Um dies festzustellen kann ihm jede Färbung dienen, vorausgesetzt nur, daß sie deutliche und gleichmäßige Praeperate liefert. Er muß nur wissen, wieviele Reticulocyten nach seiner Methode beim Gesunden zu erwarten wären.

Es würde sich deshalb empfehlen in den Krankengeschichten bei Angabe der Reticulocytenzahl auch beizufügen, nach

welcher Methode die Zählung durchgeführt wurde. Denn wurden zum Beispiel 25 $^0/_{00}$ Reticulocyten gezählt, so bedeutet das bei Färbung nach Heilmeyer eine Zunahme, nach Franke sogar eine ganz bedeutende Vermehrung, während dieser Wert nach Ederle an der oberen Grenze des Normalen gelegen, keinerlei Rückschlüsse auf das Krankheitsgeschehen zuließe.

Was bleibt noch über Heilmeyers Gruppeneinteilung und über die Ausdifferenzierung nach seinem Schema zu sagen?

Wie oben bereits ausgeführt, ist die Einteilung so günstig getroffen, daß sich jede auftretende Reticulocytenform leicht einordnen läßt. Wenn man das Reifungsschema der Netzsubstanz vom dichten Knäuel über immer zartere und und unvollständigere Netzfiguren bis zu vereinzelten Fäden und Körnchen vor Augen hat, so läßt sich die Ausdifferenzierung bei einiger Übung mühelos und ohne viel Zeitaufwand durchführen. Denn ist das Praeperat erst einmal gefärbt, so bedeutet es nicht viel Zeitunterschied ob man die Reticulocyten nur zählt, oder ob man sie zugleich in die einzelnen Gruppen einordnet, einige Übung in der Ausdifferenzierung vorausgesetzt.

Von diesem Gesichtspunkte aus wäre also gegen eine Durchführung der Ausdifferenzierung in der Klinik nichts einzuwenden. Wie steht es aber mit dem praktischen Wert dieser Untersuchung? Wenn Heilmeyer sagt, daß die Linksverschiebung der Reticulocytenformen das feinste Kriterium für eine Knochenmarksreizung sei, so ist dagegen nichts einzuwenden. Zweifellos zeigt das Auftreten jüngerer Formen der Vitalgranulation, daß das Knochenmark erhöhter Beanspruchung ausgesetzt ist. Aber bei Durchsicht unseres Materials findet sich, daß die Linksverschiebung der Formen der zahlenmäßigen Zunahme der Reticulocyten weitgehend parallel geht. Das heißt: zeigt ein Blutbild hochgradige Reticulocytose, so finden sich in ihm auch sehr junge Reticulocytenformen, und umgekehrt kann man mit Sicherheit, wenn man Zellen der Gruppe I oder gar O in einem Praeperate zu Gesicht bekommt, daraus schließen, daß hier die netzhaltigen Zellen bedeutend vermehrt sein müssen.

Daraus folgt, daß sich für den Arzt eine Ausdifferenzierung erübrigt, wenn er die Zählung der Reticulocyten vornimmt. Ihr Ergebnis könnte ihm doch nichts anderes sagen, als was er aus der Anzahl der netzhaltigen Zellen schon geschlossen hat. Anders wäre es natürlich, wollte man sich nur durch einen kurzen Blick auf ein Praeperat über den Leistungsgrad des Knochenmarks orientieren. Dann könnte die Auffindung nur einer sehr unreifen Zellform unter Umständen weite Rückschlüsse zulassen.

Zusammenfassung:

Es wurde die Gruppeneinteilung der Reticulocytenformen nach Heilmeyer untersucht und für praktisch und gut durchführbar befunden. Im Rahmen der klinischen Untersuchungen erübrigt sich aber eine Ausdifferenzierung, da Zunahme der Reticulocytenzahl und Linksverschiebung ihrer Formen weitgehend parallel gehen, sodaß Zählung und Ausdifferenzierung ziemlich das gleiche über Reizung und Funktion des Knochenmarks aussagen.

Ferner wurden die Reticulocyten bei 50 Gesunden nach der Methode Heilmeyers gezählt und ausdifferenziert. Es zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den von Heilmeyer angegebenen Zahlen. Das gleiche nach der Färbung von Ederle durchgeführt ergab bedeutend höhere Werte, wiederum in Übereinstimmung mit den Angaben des Verfassers. Vergleichsversuche mit beiden Methoden zeigten, daß durch die Färbung nach Ederle bedeutend mehr Reticulocyten zur Darstellung gelangen und daß diese Unterschiede nicht nur die fast ausgereiften Formen, sondern alle Gruppen in ungefähr gleichem Maße betreffen.

Sodann wurde dargelegt, daß es für den Arzt nicht darauf ankommt, eine besonders hohe Werte liefernde Untersuchungsmethode anzuwenden, da er nur die relative Vermehrung der Reticulocyten gegenüber dem Gesunden feststellen will, wozu ihm jede Färbung dienen kann, die deutliche und gleichmäßige Praeperate liefert. Dabei müssen ihm nur die für diese Methode als normal anzusehenden Reticulocytenwerte bekannt sein.

Zum Schlusse erlaube ich mir Herrn Professor Dr. Schittenhelm für die Überlassung des Themas und für die Durchsicht der Arbeit, sowie Herrn Professor Dr. Tiemann für freundliche Unterstützung geziemend zu danken.

Literatur:

Denecke: Normale und pathologische Physiologie der Erythrocyten (aus Handbuch der Allgemeinen Haematologie, herausgeg. von Hirschfeld-Hittmair Berlin 1932).
Duesberg: Archiv f. exper. Path. 162 (1931)/249.
Ederle Fol. haemat. Bd. 50 (1933) H. 1.
Günther: Normale und pathol. Morphologie der Erythrocyten (aus Handbuch der allgem. Haematologie, herausg. v. Hirschfeld-Hittmair, Berlin 1932).
Heilmeyer: D. Archiv f. klin. Med. Bd. 171 (1931. D. Archiv f. klin. Med. Bd. 172 (1932).
Heilmeyer u. R. Westhäuser: Zschrft. f. klin. Med. Bd. 121 (1932).
Naegeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. Lehrbuch der klin. Haematologie, Berlin 1932.
Schilling: Das Blutbild und seine klinische Verwertung. Jena 1933.
Trachtenberg Fol. Haemat. Bd. 46 (1931) H. 1.

Lebenslauf.

Ich, Friedrich Walter Wagner, wurde am 5. Mai 1913 in Aeschach bei Lindau i. Bodensee als Sohn des damaligen Bezirksamtsassessors Dr. Ernst Wagner und seiner Frau Marie, geborene Ruppert geboren.

Da mein Vater als Beamter öfters versetzt wurde, besuchte ich die Volksschule und die ersten Klassen des humanistischen Gymnasiums in München, dann drei Klassen des Gymnasiums in Speyer am Rhein, um dann wieder in München im März 1932 am Maximiliansgymnasium die Reifeprüfung abzulegen.

Das medizinische Studium begann ich im Sommersemester 1932 in Würzburg. Dort legte ich im Herbst 1933 den naturwissenschaftlichen und im Juli 1934 den anatomisch-physiologischen Teil der ärztlichen Vorprüfung ab. Die klinischen Semester hörte ich mit Ausnahme des ersten in München, wo ich im Herbst 1937 das medizinische Staatsexamen ablegte.

München, den 20. Dezember 1937. F. Wagner.

Druck von Michael Laßleben, Kallmünz über Regensburg.